DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.029



中图法分类号 R657.4

## 参考文献

1 邓新波,张云华.腹腔镜胆囊切除术的血气观察.中华麻醉学杂志,1994,14:64

2 罗爱林,马自成,金士翔.不同麻醉方法对小儿血浆肾素-血管紧张素Ⅰ-醛固酮及皮质醇的影响.中华麻醉学杂志,1993,13(增):72

(收稿:1994-05-13;修回:1994-07-29)

# 流式细胞仪用于人白血病骨髓细胞增殖特性的分析

# Characterization of proliferation of human bone marrow cells of leukemia by flow cytometry

宫立众 张书模 (第三军医大学大坪医院血液科) 630042

流式细胞仪(flow cytometer,FCM)是70年代发展起来的综合多学科的高科技产品,能对单个细胞进行定量分析,具有快速、准确、大量和多参数同时获取的特点,为研究细胞增殖动力学提供了强有力的手段[1],已广泛应用于临床肿瘤学研究[2]。白血病是造血组织常见的恶性肿瘤,为了解白血病细胞的增殖状态和特点,我们用FCM测定了40例白血病患者骨髓细胞周期分布,报告分析如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 病例

未经治疗的白血病40例,其中急性非淋巴细胞白血病(ANLL)22例($M_1$ 2例,$M_2$ 12例,$M_3$ 2例,$M_5$ 5例,$M_6$ 1例),急性淋巴细胞白血病(ALL)7例,慢性髓性白血病(CML)9例,慢性淋巴细胞白血病(CLL)2例。均经临床、血象、骨髓象和组织化学诊断。年龄11~72岁,平均36.3岁;男27例,女13例。正常对照为血象、骨髓象均正常的健康献髓者10例,男7例,女3例,平均年龄34.2岁。

### 1.2 标本制备

髂后上棘穿刺取髓液0.5~1.5 ml,肝素抗凝。用淋巴细胞分离液(比重1.077±0.002)分离单个核细胞,用pH7.2的PBS洗二遍,制成单个细胞悬液,于70%冷乙醇中固定。4℃保存待测。测定前取固定细胞$1\times10^6$,用PBS洗去乙醇,每管加入碘化丙啶(PI,Sigma)一步染液(100 ml PI一步染液中含PI 5 mg,RNase 2 mg,Triton-X-100 1 ml,生理盐水65 ml,枸橼酸钠100 mg)1 ml,振荡混匀置4℃冰箱中30 min后即可上机测量。

### 1.3 细胞周期测定和数据处理

FCM为美国Becton Dickinson公司生产的FACStar PLUS,氩离子激光器,激发功率70 mW,激光波长488 nm,DM560双色分光镜及DF585带通滤片,线性获取,每个样品测100 000个细胞。测定前用鸡血红细胞校正仪器,使其变异系数(CV)稳定在3%以内。用专用HP-9000/340型计算机及Cell-FIT程序(2.01.2版本)进行细胞周期分析,得出细胞周期各阶段的比例。用$t$检验和相关分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 正常及白血病骨髓细胞周期分布

正常骨髓细胞S+$G_2$M%为24.50±5.71,ANLL,ALL,CML,CLL的S+$G_2$M%均值均低于此值,$P<0.01$或0.05,见附表。其中急性白血病组中S+$G_2$M%高于正常均值者仅2人,余均低于正常均值。CLL的S+$G_2$M%为最低。

附表 正常及白血病骨髓细胞周期分布(%)

| 组别 | 例数 | $G_{0/1}$ | S | $G_2$M | S+$G_2$M | 范围 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 正常 | 10 | 76.75±4.44 | 17.04±4.46 | 6.37±6.66 | 24.50±5.71 | 8.9~32.0 |
| ANLL | 22 | 84.96±6.29 | 10.45±4.68 | 4.52±3.31 | 15.12±6.43 | 5.9~29.1 |
| ALL | 7 | 82.63±5.59 | 11.45±4.85 | 7.30±4.64 | 17.36±6.14 | 5.2~24.3 |
| CML | 9 | 80.53±5.64 | 15.99±4.75 | 3.93±1.93 | 19.47±5.31 | 10.7~30.1 |
| CLL | 2 | 91.85±0.78 | 6.15±1.48 | 2.00±0.71 | 8.15±0.78 | 7.6~ 8.7 |

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 2.2 骨髓细胞周期分布与原始＋幼稚细胞的比例和增生程度的关系

正常对照的原始＋幼稚细胞的比例与S＋$G_2$M％之间呈正相关，$r=0.87$，$P<0.01$。提示在正常人处于增殖状态的主要为不成熟的原始＋幼稚细胞。白血病骨髓原始＋幼稚细胞占80.9±10.2％，与S＋$G_2$M％之间无相关，$r=0.05$，反映了骨髓白血病细胞的增殖的异常状态。骨髓的增生程度按常规分为5级，与S＋$G_2$M％呈显著的负相关，$r=-0.59$，提示S＋$G_2$M％减低可能与白血病细胞负荷有一定关系。

## 3 讨论

白血病细胞周期各时相的分布是研究细胞增殖动力学的主要指标，细胞周期中S＋$G_2$M期的比例反映了白血病细胞群体中处于增殖阶段的数量，从一定程度上代表了细胞增殖状态。FCM根据细胞中DNA含量来区别处于不同增殖阶段的细胞，从而确定细胞处于细胞周期各时相的比例[1]，比用$^3$H－TdR同位素掺入的放射自显影方法测定细胞周期更快速、准确和简单。

白血病细胞处于S＋$G_2$M期的比例低，表明白血病细胞处于低增殖状态，与用同位素掺入和文献报告用FCM测定结果一致[3~6]。骨髓细胞增殖状态由高到低依次为：正常人，CML，ALL，ANLL，CLL。且白血病与骨髓细胞增生程度呈负相关，提示骨髓细胞的周期分布与白血病细胞负荷有关[6]，可能由于白血病细胞负荷大，争夺营养、生存空间缩小，白血病细胞间相互抑制作用加强等原因，使白血病细胞为了生存被迫处于低增殖状态。更主要的原因是白血病细胞本身质的异常，即增殖状态的异质性[2,5]根据有三，一是在离体培养下的白血病细胞，用$^3$H－TdR掺入测细胞周期时，在同样细胞浓度、保证营养的条件下，仍可见白血病细胞的低增殖状态[3]。二是正常骨髓细胞增殖状态与原始＋幼稚细胞的比例呈正相关，提示处于增殖状态的细胞主要为原始和幼稚细胞，相反，在白血病骨髓细胞中周期分布与原始＋幼稚细胞比例无相关，这就表明白血病骨髓细胞中原始＋幼稚细胞在增殖状态上不同于正常骨髓中的原始＋幼稚细胞，即低增殖状态。三是不同类型的白血病细胞周期分布也是有差异的。尽管白血病细胞增殖状态低下，细胞周期时间延长，但处于增殖状态的白血病细胞的多次分裂，较少的细胞丢失，清除时间延长等原因，仍导致骨髓中白血病细胞的大量聚积[7]。

在临床上，几种白血病的自然病程是不同的。ANLL、ALL、CML的S＋$G_2$M％递增与自然病程延长相吻合，一定程度上提示S＋$G_2$M％与预后有关。增殖状态愈低，自然病程愈短，预后愈差；增殖状态高，自然病程长，预后相对也好。用体外$^3$H－TdR掺入未经治疗急性白血病细胞，标记指数低者，病情重，死亡快；标记指数高者，病症轻，一般情况较好[6]。

白血病细胞大都处于非增殖状态，非DNA合成期，且有个体差异，这就决定了白血病细胞对化学治疗的敏感性差，治疗需要持久和化疗方案个体化。白血病细胞增殖状态低下为先诱导白血病细胞进入细胞周期后再杀灭之的化疗方案提供了细胞动力学理论依据。若能把白血病细胞诱导进入增殖状态，则可能更大程度地发挥化疗对白血病细胞的杀灭作用。已有文献报告，白血病细胞的增殖状态的个体差异与预后和疗效有关，S＋$G_2$M％可作为指导白血病个体化疗的细胞动力学根据[2,5]。

（感谢本院血液室洪淋，梁德佳主管技师，重庆医科大学第一附属医院血液室潘健主管技师提供骨髓标本。感谢本校中心实验室李才安高级实验师做流式细胞周期分析。感谢基础部医用物理学教研室翟建才教授在成文后的热心指导。）

**关键词**　白血病；细胞周期；流式细胞术*

**中图法分类号**　R733.7

## 参考文献

1 Horan PK, Wheeles LL. Quantitative single cell analysis and sorting. Science, 1977, 198: 149

2 Barlogie B, Raber MN, Schuman J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res, 1983, 43: 3982

3 Barserga R. Comparative study of the kinetics of cellular proliferation in normal and tumorous with the use of tritiated thymidine. J Natl Cancer Invest, 1962, 28: 331

4 Barlogie B, Latreille J, Freireich EJ, et al. Characterization of hematologic maliganies by flow cytometry. Blood Cells, 1980, 6: 719

5 Kantarjian HM, Barlogie B, Keating MJ, et al. Pretreatment cytokinetic in acute myelogenous leukemia. J Clic Invest, 1985, 76: 319

6 北京医学院. 急性白血病患者骨髓体外氚一胸腺嘧啶核苷掺入试验的初步观察. 中华内科杂志, 1978, 3: 165

7 万景华. 白血病细胞动力学改变. 中华血液学杂志, 1986, 7: 312

（收稿：1993-12-10；修回：1994-06-01）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net